

501,364

## (12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad  
Intelectual  
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional  
14 de Agosto de 2003 (14.08.2003)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional  
WO 03/066875 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes<sup>7</sup>: C12P 23/00, C12N 1/16, A23K 1/18 // A23L 1/28, (C12N 1/16, C12R 1:645

(21) Número de la solicitud internacional: PCT/ES03/00063

(22) Fecha de presentación internacional:  
3 de Febrero de 2003 (03.02.2003)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:  
P200200257 4 de Febrero de 2002 (04.02.2002) ES

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US):  
ANTIBIOTICOS, S.A.U. [ES/ES]; Avda. de Antibióticos, 59/61, E-24009 León (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): DE LA FUENTE MORENO, Juan, Luis [ES/ES]; Avda. de Antibióticos, 59/61, E-24009 León (ES). PEIRO CEZON, Enrique [ES/ES]; Avda. de Antibióticos, 59/61, E-24009 León (ES). DIEZ GARCIA, Bruno [ES/ES]; Avda. de Antibióticos, 59/61, E-24009 León (ES). MARCOS RODRIGUEZ, Ana, Teresa [ES/ES]; Avda. de

Antibióticos, 59/61, E-24009 León (ES). SCHLEISSNER SANCHEZ, Carmen [ES/ES]; Avda. de Antibióticos, 59/61, E-24009 León (ES). RODRIGUEZ SAIZ, Marta [ES/ES]; Avda. de Antibióticos, 59/61, E-24009 León (ES). RODRIGUEZ OTERO, Carmelita [ES/ES]; Avda. de Antibióticos, 59/61, E-24009 León (ES). CABRI, Walter [IT/ES]; Avda. de Antibióticos, 59/61, E-24009 León (ES). BARREDO FUENTE, José, Luis [ES/ES]; Avda. de Antibióticos, 59/61, E-24009 León (ES).

(74) Mandatario: DE ELZABURU, Alberto; Miguel Angel, 21, E-28010 Madrid (ES).

(81) Estados designados (nacional): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (regional): patente ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), patente euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), patente europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: METHOD OF PRODUCING ASTAXANTHIN BY FERMENTING SELECTED STRAINS OF <I>XANTHOPHYLLOMYCES DENDRORHOUS</I>

(54) Título: PROCEDIMIENTO DE PRODUCCIÓN DE ASTAXANTINA MEDIANTE LA FERMENTACIÓN DE CEPAS SELECCIONADAS DE XANTHOPHYLLOMYCES DENDRORHOUS

(57) Abstract: The invention relates to methods of (i) obtaining astaxanthin-overexpressing strains of *X. dendrorhous* and (ii) using said strains under improved fermentation conditions. The methods of selecting the strains used are based on: (i) resistance to steroid synthesis inhibitors, respiration inhibitors and compounds that induce the formation of free radicals; (ii) colour intensity of the colony and production of carotenoids in a solid medium; (iii) production of astaxanthin in darkness; (iv) production of astaxanthin at high temperatures; and (v) production of astaxanthin with carbon sources other than glucose. The inventive methods can be used effectively to select mutants of *X. dendrorhous* with greater production of astaxanthin than the parent strain and low accumulation of other carotenoids. The liquid medium culture of *X. dendrorhous* can be used to obtain a biomass that can be used directly in human and animal food.

(57) Resumen: La presente invención describe procedimientos para (i) la obtención de cepas de *X. dendrorhous* superproductoras de astaxantina y (ii) la utilización de las cepas anteriormente citadas en condiciones mejoradas de fermentación. Los métodos de selección de cepas utilizados se basan en: (i) resistencia a inhibidores de la síntesis de esteroides, a inhibidores de la respiración y a compuestos que inducen la formación de radicales libres, (ii) intensidad de color de la colonia y producción de carotenoides en medio sólido, (iii) producción de astaxantina en oscuridad, (iv) producción de astaxantina en condiciones de elevada temperatura y (v) producción de astaxantina con fuentes de carbono alternativas a glucosa. Estos métodos permiten seleccionar eficazmente mutantes de *X. dendrorhous* con producciones de astaxantina superiores a la cepa parental y baja acumulación de otros carotenoides. El cultivo en medio líquido de *X. dendrorhous* permite obtener una biomasa que puede utilizarse directamente en alimentación humana y animal.

WO 03/066875 A1



**Publicada:**

— *con informe de búsqueda internacional*

*Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.*

- 1 -

Procedimiento de producción de astaxantina mediante la fermentación de cepas seleccionadas de *Xanthophyllomyces dendrorhous*.

##### 5 **Campo de la invención**

La presente invención describe procedimientos para (i) la selección de cepas de *Xanthophyllomyces dendrorhous* superproductoras de astaxantina y (ii) la utilización de las cepas anteriormente citadas en condiciones mejoradas de 10 fermentación.

##### **Estado de la técnica**

Los carotenoides son pigmentos de naturaleza isoprenoide sintetizados por ciertas bacterias, hongos y 15 organismos fotosintéticos. Debido a sus efectos beneficiosos para la salud y a sus atractivos colores, los carotenoides poseen una gran importancia comercial como colorantes y aditivos alimentarios. Los carotenoides son compuestos poliénicos de 40 o 50 átomos de carbono formados 20 por 8-10 unidades de isopreno (C5). Poseen un máximo de absorción entre 400 y 500 nm, lo cual les proporciona su coloración característica entre amarillo y rojo. Los carotenoides con la cadena hidrocarbonada no sustituida (licopeno,  $\beta$ -caroteno) se denominan carotenos. Los derivados oxigenados se denominan xantofilas. Entre estas últimas 25 se incluyen alcoholes (luteína y zeaxantina), epóxidos (viòlaxantina), ésteres (esferoideno), cetonas (equinenona, cantaxantina, astaxantina) y ácidos (torularodina). La presencia del grupo cromóforo en la estructura de los 30 carotenoides tiene una importante función biológica como agente fotoprotector y antioxidante. Los carotenoides protegen los tejidos vulnerables contra los efectos de los singletes de oxígeno y los radicales libres. De este modo, el intermediario biosintético de astaxantina 3-hidroxi-

- 2 -

3',4'-didehidro- $\beta,\psi$ -caroten-4-one (HDCO) desempeña una importante función como secuestrador de radicales libres, además de proporcionar una pigmentación rojiza muy agradable. Entre las numerosas funciones biológicas que desempeñan los carotenoides destacan como anticancerígenos, 5 potenciadores del sistema inmunitario, preventivos de enfermedades degenerativas del sistema nervioso central (Alzheimer, enfermedades relacionadas con la visión, etc.), antiinflamatorios, antiestrés, fotoprotectores, etc. La 10 astaxantina es un cetocarotenoide (xantofila) ampliamente distribuido en la naturaleza cuya molécula posee once dobles enlaces conjugados. Es producida por bacterias (Agrobacterium aurantiacum, Rhodococcus maris, etc.), hongos (X. dendrorhous), algas (Haematococcus pluvialis) y 15 plantas superiores. En general todas las partes verdes de los vegetales poseen astaxantina enmascarada por clorofila, lo cual, junto con otros carotenoides, les confiere la típica coloración otoñal. Asimismo se encuentra en las flores de Adonis aestivalis), aves (flamenco e ibis 20 escarlata), peces (salmónidos) e invertebrados marinos (camarón, cangrejo, langosta, etc.) y cumple importantes funciones para la protección y supervivencia de estos seres vivos.

La producción de carotenoides por biosíntesis 25 microbiana es un ejemplo clásico de competencia entre los procesos químicos y los biológicos. Los procesos biotecnológicos muestran, entre otras, la ventaja de permitir obtener de forma simple los carotenoides de estructura más compleja, así como los isómeros 30 conformacionales que sólo existen de forma natural. Los procesos biotecnológicos industriales para la producción de astaxantina, competitivos con la síntesis química, están basados en la utilización del alga *H. pluvialis* y de la levadura *X. dendrorhous*. La producción industrial de

- 3 -

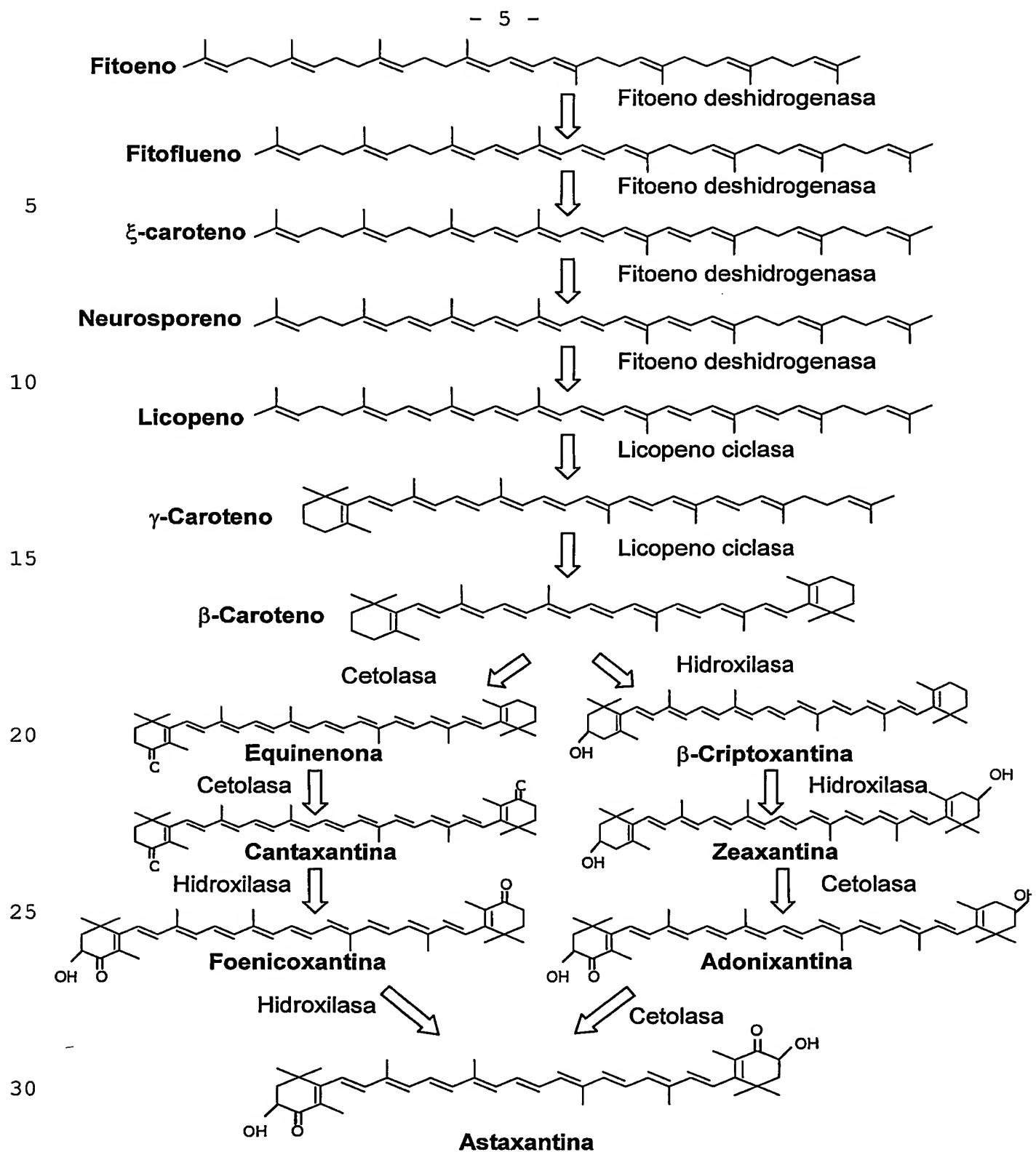
astaxantina con *H. pluvialis* supone la necesidad de amplias superficies marinas para su cultivo, la existencia de contaminaciones y la dificultad de control de ciertos factores ambientales. Por ello, cuando en 1976 se describió 5 por primera vez *X. dendrorhous* (Phaff H.F. et al. 1972. Proc. IV IFS: Ferment. Technol. Today 759-774) y se demostró su capacidad para producir astaxantina y otros carotenoides (Johnson et al. 1978. Appl. Environ. Microbiol. 35: 1155-1159), así como su eficacia en la 10 pigmentación de salmones, huevos de aves, etc., la levadura adquirió rápidamente un creciente interés industrial.

La biomasa de *X. dendrorhous* rica en astaxantina puede utilizarse como suplemento alimenticio para colorear la 15 carne de salmones. Los salmones adquieren su coloración típica en su medio natural debido a que en su alimentación incluyen microorganismos y crustáceos que contienen astaxantina. Los peces cultivados en cautividad presentaban originalmente una coloración blanquecina de la carne y la 20 piel, debido a la ausencia de astaxantina en su alimentación. La astaxantina, además de conferir color y sabor, desempeña un papel importante en la función reproductora y en el desarrollo general del pez. Actualmente la mayor parte de la astaxantina se obtiene por 25 síntesis química, ya que su extracción a partir de caparazones de crustáceos no resulta económicamente rentable. No obstante, debido a la creciente sensibilidad del consumidor a los aditivos químicos y a los productos sintéticos, se está potenciando la utilización de *X. dendrorhous* y *H. pluvialis* como fuentes naturales de 30 astaxantina.

La ruta biosintética de astaxantina (ver esquema 1) ha sido descrita en una serie de organismos como *X. dendrorhous*, *Erwinia uredovora* y *Agrobacterium aurantiacum*

- 4 -

(Ducrey Sanpietro L.M. 1998. Yeast 14: 1007-1016; Misawa N. et al. 1995. J. Bacteriol. 177: 6575-6584; Fraser P.D. et al. 1997. J. Biol. Chem. 272: 6128-6135). Para dicha biosíntesis son necesarias al menos cinco actividades enzimáticas: (i) fitoeno sintasa, la cual une dos moléculas de geranilgeranil pirofosfato generando fitoeno, (ii) fitoeno deshidrogenasa, la cual introduce cuatro dobles enlaces en la molécula de fitoeno para sintetizar licopeno, (iii) licópeno ciclase, la cual, utilizando licopeno como sustrato, se encarga de formar los anillos situados en ambos extremos de la molécula de  $\beta$ -caroteno, (iv)  $\beta$ -caroteno cetolasa, la cual cataliza la introducción de un grupo ceto en cada uno de los anillos situados en ambos extremos de la molécula de  $\beta$ -caroteno y (v)  $\beta$ -caroteno hidroxilasa, la cual realiza la hidroxilación de cada uno de los anillos situados en ambos extremos de la molécula de  $\beta$ -caroteno. Estas dos últimas actividades enzimáticas participan en la biosíntesis de una serie de precursores (equinenona, cantaxantina, foenicoxantina,  $\beta$ -criptoxantina, zeaxantina, adonixantina) de astaxantina (esquema 1). Las actividades enzimáticas  $\beta$ -caroteno cetolasa y  $\beta$ -caroteno hidroxilasa (así como los genes que las codifican) han sido caracterizadas en una serie de organismos como *E. uredovora*, *A. aurantiacum*, *Arabidopsis thaliana*, etc. y en todos los casos se ha descrito la existencia de dos proteínas independientes. Sin embargo, en *X. dendrorhous* ha sido descrita la existencia de una sola enzima denominada astaxantina sintetasa, la cual cataliza la conversión de  $\beta$ -caroteno en astaxantina (Tatsuo H. et al. 2000. EP1035206).



**Esquema 1.** Ruta biosintética simplificada de astaxantina en *X. dendrorhous*.

- 6 -

El creciente interés comercial de *X. dendrorhous* para la producción de astaxantina ha fomentado la aplicación de técnicas de tipaje molecular en este microorganismo (Adrio J.L. et al. 1995. Curr. Genet. 27:447-450). De esta forma, 5 es posible establecer diferencias entre las cepas seleccionadas en los programas de mejora. Asimismo, estas técnicas pueden ser utilizadas para controlar la calidad de la biomasa obtenida, ya que posibilitan determinar la estabilidad genética de la cepa durante la fermentación y 10 la presencia de contaminación con otros microorganismos.

La utilización de sondas de ADN está indicada para el análisis de microorganismos para los que existen sondas adecuadas y no son diferenciables con facilidad mediante métodos bioquímicos. La amplificación de ADN es el método 15 utilizado para la detección directa debido a su sensibilidad y rapidez. En la mayor parte de los casos, la detección del fragmento de ADN amplificado se realiza simplemente mediante tinción del gel de agarosa con bromuro de etidio. Entre las técnicas de tipaje molecular basadas 20 en la electroforesis de ADN se encuentran las siguientes: RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), ribotipado (hibridación con sondas de rRNA), PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis), OFAGE (Ortogonal Field Gel Electrophoresis), FIGE (Field Inversion Gel 25 Electrophoresis), CHEF (Clamped Homogeneous Electrical Field), etc. Por otra parte existen una serie de procedimientos de tipaje molecular basados en la amplificación de ADN: PCR (Polymerase Chain Reaction), PCR-RFLP, 30 REP (Repetitive Extragenic Palindromic), ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus), RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA), etc. La técnica electroforética RFLP ha sido muy utilizada para la detección de variaciones en el ADN de diferentes

- 7 -

organismos. Sin embargo, el descubrimiento de la técnica de PCR ha supuesto que métodos como el RAPD supongan alternativas rápidas y eficaces a los métodos electroforeticos. Adicionalmente, el RAPD posee la ventaja de no precisar la utilización de isótopos radiactivos y requerir menores cantidades de ADN para el análisis. Esta técnica se basa en la utilización como cebador de un oligonucleótido de pequeña longitud. Dicho oligonucleótido puede unirse a diferentes regiones del ADN genómico utilizado como molde, posibilitando la amplificación de ciertas secuencias de ADN. Los cebadores utilizados en RAPD poseen una secuencia arbitraria, normalmente con un contenido en G+C superior al 50% y ausencia de secuencias internas repetidas invertidas. El número teórico de fragmentos de ADN amplificados depende de la longitud del cebador y del tamaño del genoma empleado como molde. La amplificación está basada en la probabilidad de que: (i) el cebador encuentre una secuencia de ADN complementaria en el genoma, (ii) dicha secuencia esté situada en cadenas opuestas, (iii) aparezca en sentido inverso y (iv) a una distancia amplificable por PCR. La aparición de polimorfismos puede ser debida a cambios en la secuencia de unión del cebador (por ejemplo, mutaciones puntuales) que impiden la correcta unión del cebador al ADN molde. Asimismo, dichos polimorfismos pueden ser originados por modificaciones en la secuencia de ADN (por ejemplo, inserciones e inversiones) que alteran el tamaño del fragmento amplificado, impiden la amplificación del ADN porque dan lugar a sitios de unión del cebador demasiado distantes, originan delecciones del sitio de unión del cebador, etc.

Los métodos de selección de cepas utilizados en la presente invención se basan en: (i) resistencia a inhibidores de la síntesis de esteroides, a inhibidores de

- 8 -

la respiración y a compuestos que inducen la formación de radicales libres, (ii) intensidad de color de la colonia y producción de carotenoides en medio sólido, (iii) producción de astaxantina en oscuridad, (iv) producción de 5 astaxantina en condiciones de elevada temperatura y (v) producción de astaxantina con fuentes de carbono alternativas a glucosa. Estos métodos permiten seleccionar eficazmente mutantes de *X. dendrorhous*. Asimismo, los procedimientos de selección de cepas y fermentación 10 expuestos en la presente invención permiten alcanzar elevados niveles de producción de astaxantina y baja acumulación de otros carotenoides. El cultivo en medio líquido de *X. dendrorhous* permite obtener biomasa con valor nutritivo y potenciador de la salud debido a su contenido 15 en carotenoides, proteínas, carbohidratos, vitaminas, ácidos grasos y otros nutrientes. Dicha biomasa puede utilizarse directamente en alimentación humana y animal.

20

#### **Descripción detallada de la invención**

La presente invención describe una serie de procedimientos para la obtención de elevadas producciones de astaxantina con la levadura *X. dendrorhous*. La invención 25 consiste en (i) el diseño de métodos para la obtención y selección de mutantes de *X. dendrorhous* superproductores de astaxantina y (ii) el desarrollo de condiciones mejoradas de fermentación. Los trabajos de investigación han ido encaminados a conseguir cepas de *X. dendrorhous* con una 30 mayor concentración de astaxantina. Para ello, se han aplicado las técnicas clásicas de mutación y screening y se han optimizado tanto las materias primas como las condiciones de fermentación. La concentración de astaxantina se expresa como (i) ppm ( $\mu$ g de astaxantina pura

- 9 -

por g de biomasa seca) o (ii) porcentaje de astaxantina pura respecto de biomasa seca. Mientras que las cepas silvestres de *X. dendrorhous* producen entre 100 y 200 ppm de astaxantina, la presente patente describe procedimientos para la producción de al menos 5.000 ppm. *X. dendrorhous* posee una gran importancia industrial para la producción biotecnológica de astaxantina. De hecho, dicho proceso resulta competitivo con el procedimiento sintético utilizado industrialmente en la actualidad.

Con la finalidad de obtener cepas superproductoras de astaxantina, en primer lugar se desarrolló un procedimiento mutagénico de las cepas de *X. dendrorhous* con los agentes mutagénicos etil metano sulfonato (EMS), N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG) y radiación ultravioleta (UVA). Las suspensiones de células a mutar se obtuvieron a partir del cultivo de *X. dendrorhous* en el medio líquido R4-062-7. El procedimiento de mutación con EMS consistió en la incubación de  $10^8$  células / ml en una solución de EMS al 6% en tampón fosfato sódico 0,1 M pH 7,0 a 20°C y 100 rpm durante 40-80 minutos. El procedimiento de mutación con NTG consistió en la incubación de  $10^8$  células / ml en una solución de 250 µg/ml de NTG en tampón citrato sódico 0,1 M pH 5,0 a 20°C y 100 rpm durante 60-120 minutos. El procedimiento de mutación con UVA consistió en irradiar con un lámpara de 254 nm una suspensión de  $10^7$  células / ml en solución salina a 20°C y 40 rpm durante 5-10 minutos. En los tres métodos de mutación utilizados, las células mutadas se incubaron durante 10 horas a 17-20°C y 100 rpm en medio líquido YEPD para favorecer su recuperación. Seguidamente se sembraron placas Petri que contenían medio sólido YEPDA y se incubaron a 17°C durante 4 días para obtener colonias aisladas.

Las estrategias utilizadas para la selección de cepas de *X. dendrorhous* superproductoras de astaxantina fueron

- 10 -

las siguientes: (i) resistencia a inhibidores de la síntesis de esteroides, a inhibidores de la respiración y a compuestos que inducen la formación de radicales libres, (ii) intensidad de color de la colonia y producción de

5 carotenoides en medio sólido, (iii) producción de astaxantina en oscuridad, (iv) producción de astaxantina en condiciones de elevada temperatura y (v) producción de astaxantina con fuentes de carbono alternativas a glucosa.

10 Para la selección de mutantes superproductores de astaxantina, se crecieron las células mutadas en medio YEPDA al que se le habían adicionado (i) compuestos que alteran el potencial redox de la célula como duroquinona o peróxido de hidrógeno o (ii) inhibidores de la síntesis de esteroides, especialmente  $\beta$ -ionona, imidazol, dietilamina, 15 2-metilimidazol, nistatina y difenilamina.

Los mutantes se seleccionaron posteriormente en función de su producción en medio sólido. Dicha selección se realizó en una primera fase aislando aquellas colonias que presentaban una mayor coloración roja que la cepa 20 parental y posteriormente utilizando un método de valoración del contenido en carotenoides de la biomasa crecida en medio sólido. La selección de los mutantes que presentaban un valor de absorbancia superior al de la cepa parental VKPM Y-2476 permitió seleccionar las cepas superproductores 25 de astaxantina AST-A1 y AST-A2 (esquema 2). Los mutantes productores de astaxantina en oscuridad se seleccionaron en función de su contenido en carotenoides cuando en medio sólido cuando se incubaron en la oscuridad. De esta forma se seleccionaron las cepas AST-A3, AST-A4, AST-A5, AST-A6 y 30 AST-A7 (esquema 2). Los mutantes productores de astaxantina en condiciones de elevada temperatura se seleccionaron en función de su capacidad para crecer y producir astaxantina a temperaturas superiores a las habituales (17-20°C). De esta forma se seleccionaron las cepas AST-A8, AST-A9 y AST-

- 11 -

A10 (esquema 2) por su capacidad de crecer a 24°C y su producción de astaxantina. Las cepas de *X. dendrorhous* capaces de producir astaxantina con fuentes de carbono alternativas a glucosa se seleccionaron en función de su 5 capacidad para crecer y producir astaxantina en presencia de sacarosa como única fuente de carbono. De esta forma se seleccionó la cepa AST-A11 (esquema 2), la cual mostró una capacidad de producción de astaxantina superior a la de la cepa parental cuando se utilizó sacarosa como fuente de 10 carbono.

Las cepas seleccionadas se sometieron a una serie de análisis genéticos con la finalidad de establecer características diferenciales. De este modo se demostró la existencia de elementos extracromosómicos en las cepas de 15 *X. dendrorhous*. Adicionalmente se comprobó (i) que dichos elementos extracromosómicos (plásmidos) estaban compuestos por ADN bicatenario de conformación lineal y (ii) que las cepas superproductoras de astaxantina poseían un patrón de elementos extracromosómicos diferente del que mostraban las 20 cepas con inferior producción. Las diferencias establecidas entre las cepas superproductoras de astaxantina y las cepas con inferior producción se confirmaron adicionalmente mediante la técnica RAPD.

Las cepas seleccionadas se fermentaron en matraz con 25 la finalidad de determinar el nivel de producción de astaxantina en medio líquido. Para ello, se crecieron matraces de inóculo y posteriormente se realizó la fermentación en matraz. Una vez concluida la fermentación (alrededor de 7 días), *X. dendrorhous* se lisó mediante 30 agitación en vortex, se extrajeron los carotenoides producidos con solventes orgánicos (por ejemplo con acetona) y se determinó la concentración y pureza de astaxantina mediante HPLC. Los niveles de producción obtenidos oscilaron entre 150 y 200 mg/l. La adición al

- 12 -

medio de cultivo de (i) agentes liberadores de radicales libres como duroquinona, (ii) compuestos inductores de la carotenogénesis como retinal o ácidos trispóricos o (iii) precursores de la cadena hidrocarbonada como glutamato 5 mejoró los niveles de producción de astaxantina, alcanzándose producciones de al menos 225 mg/l con retinal, 200 mg/l con ácidos trispóricos y 180 mg/l con glutamato. Asimismo, (i) se desarrolló un medio de cultivo que incrementó la producción específica de astaxantina y (ii) 10 se comprobó que tanto la luz blanca como la ultravioleta incrementaban la producción de astaxantina, obteniéndose los mejores resultados con ciclos de 6 horas de luz ultravioleta / oscuridad.

Las cepas seleccionadas en matraz se cultivaron en 15 fermentadores pre-industriales con la finalidad de determinar el nivel de producción de astaxantina. Las condiciones de fermentación incluyeron el crecimiento inicial del microorganismo en medios de cultivo complejos que permiten la obtención de un nivel elevado de biomasa y una 20 máxima producción. Tras la etapa de crecimiento inicial se realizó una fase de producción caracterizada por un crecimiento mínimo y máxima producción. Adicionalmente, la producción de astaxantina se incrementó mediante los 25 siguientes procedimientos: (I) Adición al medio de cultivo de sustancias con poder de oxidación (por ejemplo duroquinona a una concentración 25-50  $\mu$ M) las cuales inducen la formación intracelular de radicales libres. La adición debe realizarse durante las primeras 24 horas de fermentación para que sea realmente efectiva. Estos 30 compuestos reducen el crecimiento (15-25%) e incrementan la producción de astaxantina (10-20%). Por tanto, el incremento global de la productividad específica de la biomasa puede oscilar entre el 30-60% alcanzándose en matraz producciones de astaxantina de al menos 215 mg/l en

- 13 -

6-7 días de fermentación. (II) Reducción de las adiciones de la fuente de carbono fácilmente asimilable (por ejemplo, glucosa) en una fase avanzada de fermentación y sustitución parcial por una fuente de carbono de utilización más lenta (por ejemplo etanol, glicerol, etc.) que permita mantener un crecimiento menos vigoroso pero suficiente para el mantenimiento de la biomasa productiva. (III) Iluminación del cultivo en la fase de producción con luz de alta intensidad (por ejemplo, superior a 250 lux). (IV) Modificación de los valores de pH y temperatura hacia condiciones que potencian la producción sobre el crecimiento. A temperaturas alrededor de 17°C y pHs cercanos a 3 se ralentiza el crecimiento y se incrementa la productividad. El efecto conjunto de estas variables permitió incrementar la producción de astaxantina y obtener un elevado nivel de biomasa. Esto significa una mayor productividad por unidad de volumen de fermentador, uno de los objetivos de producción más importantes desde el punto de vista industrial.

El proceso de fermentación se realizó en un medio de cultivo que contiene fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, sales minerales y vitaminas (por ejemplo, tiamina, biotina, pantotenato cárlico, etc.). Como fuentes de carbono se pueden utilizar nutrientes ricos en carbohidratos como dextrinas, almidones, glucosa, sacarosa, fructosa o harinas vegetales ricas en algunos de estos azúcares. Como fuentes de nitrógeno pueden utilizarse (i) compuestos orgánicos como extracto de levadura, harina de algodón (Pharmamedia), corn steep, harina de soja, peptonas, caseína, etc. o (ii) inorgánicos como sulfato amónico, fosfato diamónico, etc. Entre las sales minerales que pueden adicionarse al medio de cultivo se encuentran fosfatos, sulfatos o cloruros de cationes monovalentes (sodio, potasio, amonio, etc.) o divalentes (calcio, magnesio,

- 14 -

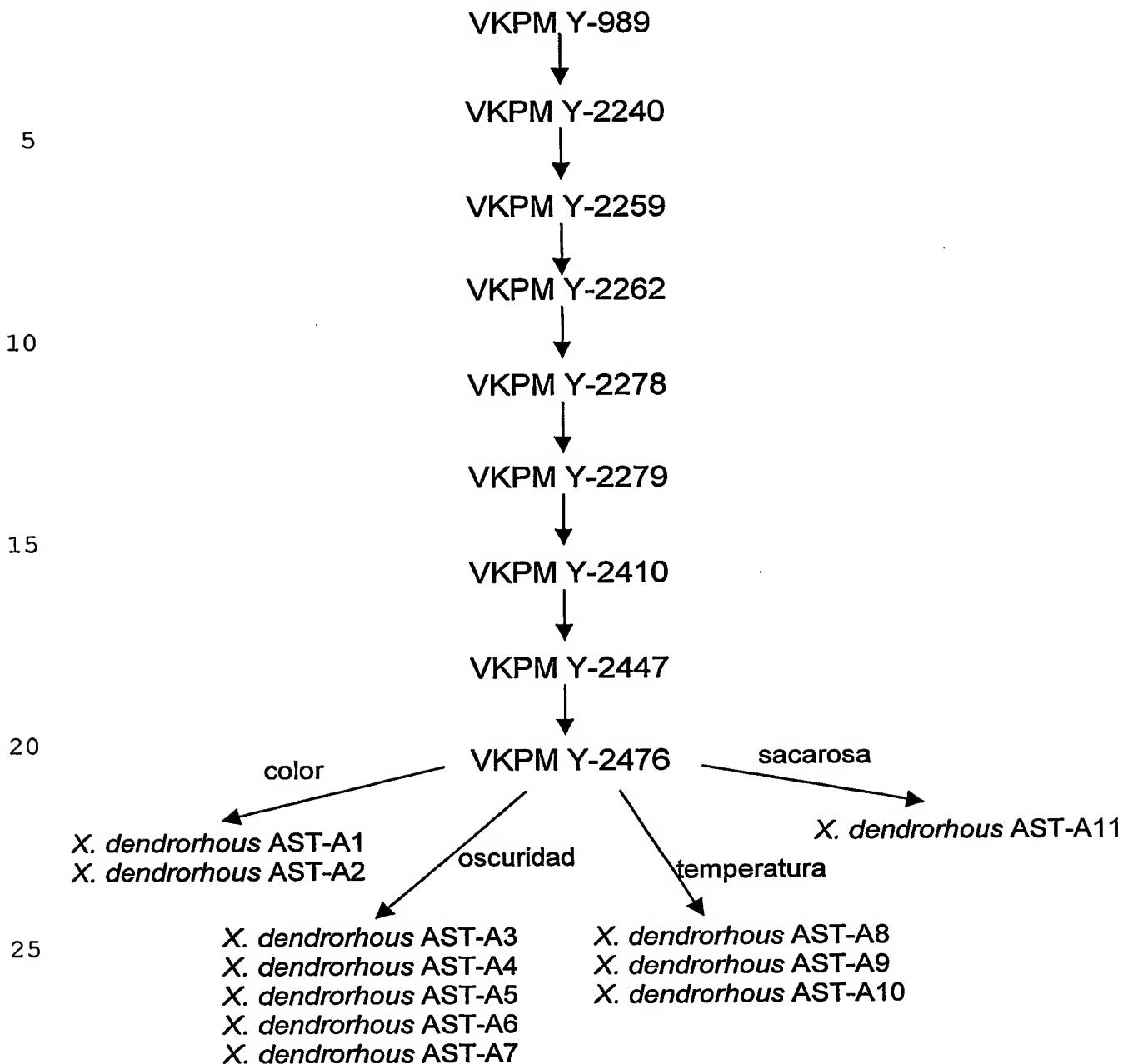
etc.). Asimismo, al medio de cultivo pueden adicionarse ciertos elementos traza como Cu, I, Fe, Mn, Mo, Zn, etc. Las proporciones de los nutrientes se determinaron en base a las 5 necesidades de crecimiento del microorganismo y a los niveles de producción. La fermentación se realizó en cultivo aerobio sumergido a una temperatura entre 17°C y 22°C, excepto cuando se utilizaron mutantes capaces de producir astaxantina a 24°C. El pH del cultivo se permitió 10 evolucionar libremente durante las primeras horas y posteriormente se controló en el rango 3,0-5,0 mediante la adición de álcali. El inicio del control de pH depende de la evolución del crecimiento, comenzando generalmente durante las primeras 24 horas de fermentación. El proceso se 15 caracterizó por un elevado crecimiento inicial basado en la disponibilidad de fuentes de carbono y nitrógeno, una aireación superior a 1 v/v/m (volumen / volumen / minuto) y una velocidad de agitación que garantizó un nivel de oxígeno disuelto superior al 50% una vez concluida la fase de 20 crecimiento inicial. El crecimiento de *X. dendrorhous* se mantuvo mediante adiciones de fuente de carbono (generalmente glucosa) de forma que permitiera conseguir la máxima concentración de biomasa con elevada producción 25 específica. La consecución de este objetivo posibilita una mayor productividad por volumen instalado de fermentador respecto de las tecnologías anteriormente desarrolladas.

Mediante las estrategias anteriormente descritas se consiguieron obtener caldos de fermentación con una biomasa superior a 70 g/l y una producción de al menos 400 mg/l, lo 30 cual supone producciones de astaxantina por unidad de biomasa superiores a 5.000 ppm. La biomasa obtenida procede de nuevas cepas de *X. dendrorhous*, las cuales pueden diferenciarse de otras cepas de la misma especie mediante

- 15 -

métodos de tipaje molecular. Además de la selección de cepas superproductoras de astaxantina, se ha optimizado la tecnología de fermentación para hacerla más rentable industrialmente. A pesar de que se han descrito producciones 5 de biomasa de *X. dendrorhous* con un contenido en astaxantina elevado, en esos casos el crecimiento de la levadura en el caldo de cultivo es muy limitado (5-30 g/l). Esto significa que el volumen de caldo que se debe procesar para obtener una cantidad importante de carotenoides es muy elevado. 10 Nuestros resultados aportan un nuevo proceso de fermentación por el que se alcanzan, no solo producciones de carotenoides elevadas, sino también una concentración de levaduras en el caldo de fermentación de 50-100 g/l. Estos resultados aportan una importante ventaja para la productividad 15 industrial y el ahorro de costes de producción.

- 16 -



30 **Esquema 2.** Filogenia de las cepas de *X. dendrorhous* obtenidas a partir de *X. dendrorhous* VKPM Y-989 utilizando procedimientos de mutación y selección.

- 17 -

La biomasa se separó del medio de cultivo por centrifugación o filtración, se secó y se utilizó para realizar una serie de pruebas de biodisponibilidad en trucha. Para ello se adicionó dicha biomasa seca al 5 preparado alimenticio de las truchas y con la mezcla se alimentaron una serie de truchas durante 2 meses. Por último, se valoró la presencia de astaxantina y carotenoides en el tejido de 10 de dichas truchas. Los resultados obtenidos (3,5 µg/g de astaxantina y 6,8 µg/g de 10 carotenoides) demostraron la capacidad de la biomasa de *X. dendrorhous* para conferir una pigmentación asalmonada a la trucha.

**Depósito de microorganismos de acuerdo con el Tratado de 15 Budapest.**

Las cepas de *X. dendrorhous* han sido depositadas, según lo previsto en el Tratado de Budapest, en la Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM), GNII Genetika, Dorozhny Proezd 1, Moscú 113545, (Rusia), 20 con los siguientes números y fechas: VKPM Y-989 el 13/03/1989, VKPM Y-2240 el 20/12/1996, VKPM Y-2259 el 31/01/1997, VKPM Y-2262 el 10/06/1997, VKPM Y-2278 el 06/08/1997, VKPM Y-2279 el 31/10/1997, VKPM Y-2410 el 30/10/1998, VKPM Y-2447 el 22/09/1999 y VKPM Y-2476 el 25 06/03/2000.

Los siguientes ejemplos describen en detalle y sin limitación la presente invención.

**EJEMPLO 1**

**30 Estrategias de mutación de *X. dendrorhous***

En primer lugar se desarrolló un procedimiento mutagénico de las cepas de *X. dendrorhous*, para lo cual se analizaron: (i) diferentes tipos de agentes mutagénicos, (ii) concentración del mutágeno, (iii) concentración de 35 células, (iv) pH de incubación y (v) tiempo de tratamiento.

- 18 -

De esta forma se seleccionaron como agentes mutagénicos etilmetasulfonato (EMS), N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG) y radiación ultravioleta (UVA).

Las suspensiones de células a mutar se obtuvieron 5 sembrando un cultivo líquido en matraces de 500 ml con 25 ml de medio R4-062-7 e incubándolo durante 24 horas a 17-20°C y 250 rpm. La composición del medio R4-062-7 es la siguiente: 6,2 g/l de extracto de levadura, 5,5 g/l de harina de algodón, 70 g/l de glucosa, 2 g/l de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,4 10 g/l de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1,5 g/l de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2 g/l de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,2 g/l de NaCl, 0,2 g/l de  $\text{CaCl}_2$ , 50  $\mu\text{g}/\text{l}$  de biotina, 500  $\mu\text{g}/\text{l}$  de tiamina y 2 mg/l de pantotenato cárlico, a un pH final de 5,8-6,0. La concentración de células en la suspensión 15 fue alrededor de  $10^8$  células/ml. Estas células se lavaron dos veces con solución salina centrifugando a 3.000 rpm y 10°C durante 3 minutos y seguidamente se ajustó su concentración a  $2 \times 10^8$  células/ml.

El procedimiento de mutación con EMS consistió en la 20 incubación de  $10^8$  células/ml en una solución de EMS al 6% en tampón fosfato sódico 0,1 M pH 7,0 a 20°C y 100 rpm durante 40-80 minutos, consiguiendo tasas de mortalidad del 90-99%. El procedimiento de mutación con NTG consistió en la 25 incubación de  $10^8$  células/ml en una solución que contenía 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de NTG en tampón citrato sódico 0,1 M pH 5,0 a 20°C y 100 rpm durante 60-120 minutos, consiguiendo tasas de mortalidad del 90-99%. Las células mutadas se lavaron tres veces con solución salina centrifugando a 3.000 rpm y 10°C durante 3 minutos y posteriormente se cultivaron en medio líquido para favorecer su recuperación. Para ello, se 30 resuspendieron en 10 ml de medio YEPD y se incubaron en matraces de 250 ml durante 10 horas a 17-20°C y 100 rpm. La composición del medio YEPD es la siguiente: 20 g/l de bacto-peptona, 10 g/l de extracto de levadura y 20 g/l de glucosa, a un pH final de 6,0.

- 19 -

El procedimiento de mutación con UVA consistió en el tratamiento de una suspensión de  $10^7$  células/ml en solución salina con la radiación de una lámpara de 254 nm a 20°C y 40 rpm durante 5-10 minutos, consiguiendo tasas de mortalidad del 90-99%. Las células mutadas se dejaron en reposo en oscuridad durante 30 minutos y seguidamente se cultivaron en medio líquido para conseguir su recuperación. Para ello, se resuspendieron en 10 ml de YEPD y se incubaron en oscuridad en matraces de 250 ml durante 10 horas a 17-20°C y 100 rpm.

Con las células mutadas se sembraron placas Petri que contenían medio sólido YEPDA y se incubaron a 17°C durante 4 días para obtener colonias aisladas. La composición del medio YEPDA es la siguiente: 20 g/l de bacto-peptona, 10 g/l de extracto de levadura, 20 g/l de glucosa y 20 g/l de agar a un pH final de 6,0. Las placas sembradas se incubaron a 17°C durante 4 días para obtener colonias aisladas.

## 20 EJEMPLO 2

**Estrategias de selección de cepas de *X. dendrorhous* superproductoras de astaxantina en función de la producción de carotenoides en medio sólido.**

Las colonias obtenidas a partir de las células mutadas descritas en el ejemplo 1 se sembraron directamente en el medio YEPDA o en medio YEPDA al que se habían adicionado (i) compuestos que alteran el potencial redox de la célula o (ii) inhibidores de la síntesis de esteroides. Entre los compuestos de tipo (i) se utilizaron particularmente duroquinona (100  $\mu$ M) y peróxido de hidrógeno (5 mg/l), mientras que entre los de tipo (ii) se emplearon especialmente  $\beta$ -ionona (50  $\mu$ l/l), imidazol (5 mM), dietilamina (10  $\mu$ M), 2-metilimidazol (5 mM), nistatina (1 mg/l) y difenilamina (100  $\mu$ M).

- 20 -

Las colonias procedentes de los cultivos anteriormente mencionados se sembraron de nuevo en medio YEPDA en forma de estriás de alrededor de 3 cm<sup>2</sup> y se incubaron a 17-20°C durante 4 días en presencia de luz. En una primera fase del 5 programa de selección de cepas fue posible aislar una serie de estriás que presentaban mayor coloración roja que la cepa parental. Posteriormente, la coloración roja intensa de las cepas parentales impidió la selección directa por color y se desarrolló un método de valoración de 10 carotenoides a partir de la biomasa crecida en medio sólido. Este método consistió en retirar de cada estriá la biomasa correspondiente a 0,8 cm<sup>2</sup> y resuspenderla en 1 ml de dimetilsulfóxido. Los carotenoides se extrajeron mediante 15 agitación en vórtex durante 2 minutos y centrifugación a 12.000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. La producción de carotenoides se valoró mediante medición de 20 la absorbancia del sobrenadante a 474 nm. La selección de las estriás que presentaban un valor de absorbancia superior al de la cepa parental VKPM Y-2476 permitió seleccionar los mutantes superproductores de astaxantina AST-A1 y AST-A2.

### EJEMPLO 3

#### Estrategias de selección de cepas de *X. dendrorhous* 25 superproductoras de astaxantina en oscuridad

El procedimiento consistió en la evaluación de los mutantes por su capacidad de crecer y producir astaxantina en ausencia de luz. Para ello se sembraron una serie de 30 placas de YEPDA con una suspensión de células mutadas y se incubaron a 22°C durante 4 días en ausencia de luz. Seguidamente se seleccionaron un total de 103 colonias que presentaban mayor coloración y crecimiento. Estas colonias se sembraron de nuevo en YEPDA en forma de estriás de alrededor de 3 cm<sup>2</sup> y se incubaron a 22°C durante 4 días en

- 21 -

ausencia de luz. Con la biomasa correspondiente a 0,8 cm<sup>2</sup> de cada estría se sembraron matraces de 50 ml con 10 ml de medio R4-062-7, los cuales se incubaron durante 72 horas a 20°C y 250 rpm en ausencia de luz. A partir de estos 5 cultivos se seleccionaron 5 mutantes (AST-A3, AST-A4, AST-A5, AST-A6 y AST-A7) con mayor producción de carotenoides, los cuales se ensayaron en fermentaciones tanto en oscuridad como en presencia de luz, observándose que la producción de astaxantina duplicaba a la de la cepa 10 parental VKPM Y-2476 en oscuridad y era equivalente en presencia de luz.

#### EJEMPLO 4

15 **Estrategias de selección de cepas de *X. dendrorhous* superproductoras de astaxantina en condiciones de elevada temperatura**

El procedimiento consistió en el análisis de los mutantes por su capacidad de crecer y producir astaxantina a temperaturas superiores a las habituales para *X. dendrorhous* (17-20°C). El programa se realizó en dos fases: 20 en primer lugar a 22°C y posteriormente a 24°C. Para ello, se sembró una suspensión de células mutadas con NTG procedentes de la cepa VKPM Y2476 en placas con YEPDA y se incubaron a 22°C durante 6 días en ausencia de luz. En 25 estas condiciones la cepa parental VKPM Y-2476 es incapaz de crecer. De esta forma se aislaron 100 colonias por su capacidad de crecer a 22°C. Estas colonias se sembraron de nuevo en YEPDA en forma de estrías de unos 3 cm<sup>2</sup> y se incubaron a 22°C durante 4 días en presencia de luz. 30 Seguidamente se realizó una valoración de la producción de carotenoides en medio sólido y se seleccionaron un total de 10 cepas, las cuales se fermentaron en medio líquido tanto a 20°C como a 22°C. Finalmente se preseleccionaron 4 cepas.

- 22 -

Una suspensión celular conjunta de las cepas 4 cepas anteriormente seleccionadas se sometió a mutación con NTG tal y como se indica en el ejemplo 1, sembrando las células mutadas en YEPDA e incubando seguidamente las placas a 5 23,5°C durante 6 días en ausencia de luz. De esta forma se seleccionaron 200 colonias, las cuales se sembraron de nuevo en YEPDA en forma de estrías de unos 3 cm<sup>2</sup> y se incubaron a 24°C durante 4 días en presencia de luz. Posteriormente se valoró la producción de carotenoides en 10 medio sólido, seleccionándose un total de 6 cepas. Una vez analizada la producción de astaxantina a 24°C en medio líquido de estas 6 cepas, se seleccionaron 3 de ellas, las cuales se denominaron AST-A8, AST-A9 y AST-A10.

15 **EJEMPLO 5**

**Estrategias de selección de cepas de *X. dendrorhous* capaces de producir astaxantina con fuentes de carbono alternativas a glucosa**

Las colonias obtenidas a partir de las células mutadas 20 descritas en el ejemplo 1 se sembraron directamente en el medio YEPDA al que se habían adicionado glucosa (20 g/l) o sacarosa (20 g/l). Las colonias procedentes de los cultivos anteriormente mencionados se sembraron de nuevo en medio YEPDA-glucosa o YEPDA-sacarosa en forma de estrías de 25 alrededor de 3 cm<sup>2</sup> y se incubaron a 17-20°C durante 4 días en presencia de luz. Posteriormente se valoraron los carotenoides en la biomasa correspondiente a 0,8 cm<sup>2</sup> de cada estría tal y como se indica en el ejemplo 2 y se seleccionaron las estrías que presentaban un valor de 30 absorbancia superior al de la cepa parental VKPM Y-2476. De esta forma se seleccionó la cepa AST-A11, la cual mostró una producción de astaxantina superior a VKPM Y-2476 utilizando como fuente de carbono glucosa o sacarosa.

**EJEMPLO 6**

**Analisis genetico de una serie de una serie de cepas de *X. dendrorhous* que presentan diferente produccion de astaxantina**

5 **6.1. Caracterización de los elementos extracromosómicos de *X. dendrorhous***

Con la finalidad de comparar una serie de cepas silvestres de *X. dendrorhous* con las cepas superproductoras de astaxantina, se realizó el análisis de sus ácidos nucleicos en gel del 0,8% de agarosa. Las 4 cepas silvestres analizadas fueron: CECT 1690 (también denominada ATCC 24202 ó CBS 5905), CECT 11028 (también denominada ATCC 24203 ó CBS 5908), CBS 6938 y ATCC 24229. Por su parte las cepas superproductoras analizadas fueron las siguientes: 15 VKPM Y-989, VKPM Y-2240, VKPM Y-2259, VKPM Y-2279, VKPM Y-2410 y VKPM Y-2476. Una vez purificado el ADN total de las cepas anteriormente mencionadas, se trató con RNasa y se analizó por electroforesis. El resultado se muestra en la figura 1. Como puede observarse, las cepas superproductoras poseen un patrón de ácidos nucleicos extracromosómicos diferente del que presentan las cepas silvestres. El patrón más parecido al de las cepas superproductoras lo posee la cepa *X. dendrorhous* ATCC 24229.

En diferentes cepas de *X. dendrorhous* se ha descrito 25 la presencia de elementos genéticos extracromosómicos, principalmente ARNs de doble cadena (ARNds) que en algunas cepas se han encontrado encapsidados en partículas similares a virus (VLP, virus like particles) (Castillo A. and Cifuentes V. 1994. Curr. Genet. 26: 364-368; Pfeiffer, H. 30 et al. (1996). Curr. Genet. 30: 294-297). Con la finalidad de determinar si los elementos extracromosómicos de las cepas superproductoras eran moléculas de ARNds, se trataron con RNasa A (350 ng/ml) en dos concentraciones salinas distintas: SSC 0,01x y SSC 2x. Adicionalmente se preparó

- 24 -

una muestra control sin tratar con Rnasa A en SSC 0,01x. Dichas muestras se incubaron durante 30 minutos a 37°C y posteriormente se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8%. Como se puede observar en la figura 5 2, ningún elemento extracromosómico se degradó tras la incubación con RNasa A, por lo que se concluyó que dichos ácidos nucleicos no se trataba de moléculas de ARNds.

Con el fin de determinar la naturaleza de dichos elementos extracromosómicos, se trató una muestra de ADN 10 total de *X. dendrorhous* Y-2410 con distintas enzimas modificadoras de ácidos nucleicos: RNasa A, RNasa H, nucleasa S1, DNasa I y la endonucleasa de restricción *BamHI*. Los resultados se muestran en la figura 3. La digestión con RNasa A confirmó los resultados anteriormente 15 descritos. Sin embargo, (i) la completa desaparición tanto de los elementos extracromosómicos como del ADN total en el carril 9 (tratamiento con DNasa I) y (ii) su susceptibilidad a la digestión con la endonucleasa de restricción *BamHI* (carril 10) demostró que se trataba de 20 moléculas de ADN.

Seguidamente se procedió a determinar la conformación de los elementos extracromosómicos en las cepas *X. dendrorhous* CBS 6938 y *X. dendrorhous* Y-2410. Para ello, se analizó una muestra de ADN total mediante electroforesis 25 bidimensional en gel de agarosa al 1%. Como puede observarse en la figura 4, el patrón de elementos extracromosómicos de ambas cepas es el mismo en las dos dimensiones del gel, es decir, los fragmentos de ADN migran conforme a su tamaño. Esto indica que las moléculas de ADN detectadas 30 en *X. dendrorhous* poseen conformación lineal. De estos datos se concluye que los elementos extracromosómicos de las cepas analizadas son plásmidos lineales formados por ADN de doble cadena.

- 25 -

**6.2. Determinación del polimorfismo genético de una serie de cepas de *X. dendrorhous* mediante la técnica RAPD**

El objetivo consiste en determinar la existencia de diversidad genética en las distintas cepas de *X. dendrorhous* mediante la amplificación al azar de su ADN por PCR. Esta técnica se denomina RAPD (randomly amplified polymorphic DNA). Los polimorfismos se detectan debido a la presencia de (i) cambios (por ejemplo mutaciones puntuales) en la secuencia de unión del cebador, (ii) alteraciones en la secuencia de ADN (por ejemplo inserciones e inversiones) que dan lugar a modificaciones del tamaño, (iii) inserciones que cambian el tamaño de un fragmento de ADN amplificado, (iv) desaparición del sitio de unión del cebador, etc. En este estudio se incluyeron las 4 cepas silvestres y las 6 cepas superproductoras descritas en el apartado 6.1. Para el análisis se utilizó el cebador 5'-CATGTGTGGCGGGCA-3' previamente descrito (Williams J.G. et al. 1990. Nucleic Acids Res. 18: 6531-6535), el cual había sido utilizado previamente en *X. dendrorhous* (Meyer P.S. et al. 1994. Biotechnol. Tech. 8: 1-6). El ADN total se desnaturó mediante calentamiento durante 5 minutos a 96°C y la reacción de PCR se realizó en un volumen final de 50 µl en un GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer). Se realizaron 35 ciclos de amplificación en las siguientes condiciones: anillamiento a 30°C durante 1 minuto, polimerización durante 2 minutos a 72°C y desnaturación durante 1 minuto a 92°C. En el último ciclo el tiempo de polimerización se extendió a 10 minutos a 72°C, seguido de un enfriamiento a 4°C. Los fragmentos de ADN amplificados mediante esta técnica se sometieron a electroforesis de agarosa al 1% y los resultados obtenidos se muestran en la figura 5. Como puede observarse, las cepas superproductoras de astaxantina generaron un patrón equivalente, mientras que la cepa *X. dendrorhous* ATCC 24229 (la cual resultó ser

- 26 -

la más parecida a las cepas superproductoras en el análisis realizado en el apartado 6.1) presentó un patrón de amplificación distinto al de las cepas superproductoras. De esta experimentación se puede concluir que las cepas 5 superproductoras de astaxantina difieren genéticamente de todas las cepas silvestres analizadas.

#### EJEMPLO 7

##### Procedimiento de producción de astaxantina mediante la 10 fermentación en matraz de *X. dendrorhous*

En primer lugar se sembraron slants con medio R3-02-5 y se incubaron durante 5 días a 17-20°C. La composición del medio R3-02-5 es la siguiente: bactopeptona 6,5 g/l, extracto de levadura 2 g/l,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,4 g/l,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1,3 g/l, 15  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1,3 g/l,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,3 g/l,  $\text{NaCl}$  0,1 g/l,  $\text{CaCl}_2$  0,1 g/l, glucosa 50 g/l, agar 20 g/l,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  500  $\mu\text{g}/\text{l}$ ,  $\text{CuSO}_4$  40  $\mu\text{g}/\text{l}$ ,  $\text{KI}$  100  $\mu\text{g}/\text{l}$ ,  $\text{FeCl}_3$  200  $\mu\text{g}/\text{l}$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  400  $\mu\text{g}/\text{l}$ ,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  200  $\mu\text{g}/\text{l}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  400  $\mu\text{g}/\text{l}$ , pH 6,0. Una vez crecido el microorganismo, cada slant se resuspendió en 3 20 ml de solución salina y con esta suspensión se sembraron matraces de 500 ml con 25 ml de medio R4-062-7 a razón de 1,5 ml de suspensión de células por matraz. Estos inóculos se incubaron durante 48 horas a 17-20°C y 250 rpm.

Los inóculos se utilizaron para sembrar matraces de 25 500 ml (3 indentaciones) con 25 ml de medio R4-20 a razón de 2,5 ml por matraz. La composición del medio R4-20 es la siguiente: extracto de levadura 6,2 g/l, harina de algodón 5,5 g/l,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 g/l,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,4 g/l,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1,5 g/l, 30  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2 g/l,  $\text{NaCl}$  0,2 g/l,  $\text{CaCl}_2$  0,2 g/l,  $\text{CaCO}_3$  1,6 g/l, glucosa 200 g/l, biotina 50  $\mu\text{g}/\text{l}$ , tiamina 500  $\mu\text{g}/\text{l}$ , pantotenato cárlico 2 mg/l, pH 5,8-6,0. Estos matraces se incubaron a 17-20°C en presencia de luz durante 5-7 días. Los niveles de producción de astaxantina de la cepa VKPM Y-

- 27 -

2476 en estas condiciones fueron alrededor de 150 mg/l y 4.000 ppm con una biomasa de 37 g/l.

#### EJEMPLO 8

5 **Mejora de la producción de astaxantina mediante modificaciones en el medio de cultivo**

Con la finalidad de mejorar la producción de astaxantina se probó la adición de diferentes compuestos al medio de cultivo: (i) agentes liberadores de radicales libres como duroquinona (25-50  $\mu$ M), (ii) compuestos inductores de la carotenogénesis en otros microorganismos productores de carotenoides, como retinal (35  $\mu$ M) y ácidos trispóricos (50-100  $\mu$ g/ml), (iii) moléculas precursoras de la cadena hidro-carbonada como glutamato (5,5 mg/ml) en 10 lugar de harina de algodón. La fermentación se realizó tal y como se describe en el ejemplo 7 y los resultados obtenidos se muestran en la figura 6. Los niveles de producción de astaxantina obtenidos en las mejores condiciones fueron de 225 mg/l y 5.000 ppm con una biomasa 15 de 45 g/l. Como puede comprobarse, todos estos compuestos dieron lugar a incrementos de producción respecto al medio de cultivo original R4-20.

#### EJEMPLO 9

25 **Desarrollo de un medio de cultivo que incrementa la producción específica de astaxantina**

Con la finalidad de incrementar la producción específica de astaxantina (mg de astaxantina / g de biomasa) se desarrolló un medio de cultivo utilizando el programa 30 informático GALOP basado en algoritmos genéticos y desarrollado por Weuster-Botz D. (Institut fur Biotechnologie, Forschungszentrum Julich GmbH, Julich, Germany). El diseño se basó en mantener constantes las concentraciones de algunos de los componentes del medio de

- 28 -

cultivo ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{CaCl}_2$  y  $\text{CaCO}_3$ ) y analizar concentraciones variables de otros componentes (glucosa, glicerol, peptona, corn steep sólido (CSS), sulfato amónico y aceite de soja). Mediante el programa 5 GALOP se diseñaron 7 medios de cultivo que constaban de los mismos componentes pero en concentraciones variables. En la tabla I se muestra la composición de los medios de cultivos analizados en la 4<sup>a</sup> generación.

10

Tabla I

Medio de cultivo	Glucosa 50% (ml)	Glicerol 50% (μl)	Peptona 10% (ml)	CSS 10% (ml)	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10% (μl)	Aceite soja (ml)	Sales 25x (ml)	Agua (ml)
P	10,0	5	1,5	1,4	500	0,1	3	8,50
1	9,9	2621	1,6	1,4	572	0,1	3	8,50
2	6,7	1987	1,5	1,4	1746	1,6	3	7,06
3	10,0	5	1,5	0,2	762	0,1	3	9,43
4	6,9	325	1,9	1,7	117	0,1	3	10,96
5	10,0	639	1,5	0,4	1778	0,1	3	7,58
6	9,9	4683	1,9	0,2	508	0,1	3	4,76

La solución de sales 25x contenía por litro: 50 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 10 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 37,5 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 5 g de  $\text{NaCl}$ , 5 g de  $\text{CaCl}_2$  y 40 g de  $\text{CaCO}_3$ . En la figura 7 se muestran los 15 resultados de producción específica obtenidos con estos medios de cultivo tras realizar 4 generaciones sucesivas de optimización de su composición. Como puede comprobarse, se consiguió desarrollar un medio de cultivo que incrementó la producción específica de astaxantina de la cepa X. 20 *dendrorhous* Y-2410 desde 2.096 ppm ( $\mu\text{g/g}$ ) (medio de cultivo P) hasta 4.490 ppm (medio de cultivo 5) sin disminución de la producción absoluta (mg/l).

**EJEMPLO 10****Mejora de la producción de astaxantina mediante la iluminación del cultivo**

5        Con la finalidad de desarrollar métodos de producción de astaxantina mejorados, se fermentó en matraz la cepa Y-2476 modificando la longitud de onda de la iluminación utilizada. Para ello, se realizaron una serie de fermentaciones tal y como se describe en el ejemplo 7. Los  
10      matraces se incubaron a 17-20°C en presencia o ausencia de luz durante 6 días. Adicionalmente se probaron diferentes tipos de luz: blanca, azul, verde, amarilla y ultravioleta. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 8A. Como puede comprobarse, tanto la luz blanca como la ultravioleta  
15      dieron lugar a los incrementos de producción más significativos respecto de las fermentaciones realizadas en oscuridad.

Asimismo, se comparó la producción de astaxantina de la cepa Y-2476 en fermentaciones en matraz iluminadas permanentemente o mediante ciclos de iluminación / oscuridad de 6, 12 ó 24 horas. Dichos ciclos se realizaron tanto con luz blanca como con luz ultravioleta. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 8B. Como puede comprobarse, los ciclos de 6 horas de luz ultravioleta / oscuridad dieron lugar a los incrementos de producción más significativos.

**EJEMPLO 11****Procedimiento de producción de astaxantina mediante la fermentación de *X. dendrorhous* en fermentador de 10 litros**

Los matraces de inóculo (2 litros con 200 ml de medio R4-062-7, ejemplo 1) se sembraron con las células de un slant por matraz y se incubaron a 20°C bajo iluminación con agitación orbital a 250 rpm durante 48 horas. De esta forma

- 30 -

se obtuvo un caldo con un 7% de biomasa (expresado como volumen celular sedimentado o PCV, pellet cell volume) y un pH en torno a 3. Seguidamente se inoculó un fermentador intermedio de crecimiento vegetativo con medio R4-10-3P con el 0,4% (v/v) del inóculo. La composición por litro del medio R4-10-3P es la siguiente: extracto de levadura 6,2 g, harina de algodón 5,5 g, glucosa 100 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,4 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1,5 g,  $\text{PO}_4\text{H}(\text{NH}_4)_2$  5 g,  $\text{NaCl}$  0,2 g,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,4 g y tiamina 0,5 mg, a un pH final de 5,8-6,0.

El vegetativo se incubó a 20°C durante 48 horas con la agitación suficiente para mantener como mínimo un 50% de oxígeno disuelto ( $\text{DO}_2$ ), aireación a 1,5 vvm (volumen/volumen/minuto) y control de pH a 4,5 con amoniaco a una concentración del 12,5%. El crecimiento obtenido en la fase vegetativa alcanzó un 30-35% de biomasa (expresado como PCV). La fase de producción se realizó en un fermentador con vaso de vidrio de borosilicato con medio R4-10 cuya composición con respecto al volumen después de siembra (9 litros) es la siguiente: extracto de levadura 6,2 g/l, harina de algodón 5,5 g/l,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 g/l,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,4 g/l,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1,5 g/l,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  5 g/l,  $\text{NaCl}$  0,2 g/l,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,2 g/l, solución de microelementos 2 ml/l y polipropilénglicol 2025 0,9 g/l, ajustando el pH a 5,4 con NaOH. La composición de la solución de microelementos es la siguiente: ácido bórico 1 mg, molibdato sódico dihidrato 0,4 mg, sulfato de zinc heptahidrato 0,8 mg, cloruro férrico hexahidrato 0,4 mg, sulfato de cobre pentahidrato 0,8 mg, yoduro potásico 0,2 mg, sulfato de manganeso tetrahidrato 0,8 mg. El medio se enrasó a un volumen de 6 litros y tras la esterilización se añadieron 1,05 litros de jarabe de glucosa (para lograr una concentración de glucosa de 100 g/l tras la siembra) y 1 ml/l de solución de vitaminas (biotina 0,1 g/l, tiamina 1 g/l y pantotenato cálcico 4 g/l). El fermentador se inoculó con 2 litros del cultivo vegetativo y se ajustó a las siguientes condiciones de

- 31 -

vegetativo y se ajustó a las siguientes condiciones de cultivo: (I) Aireación: 1,5 vvm. (II) Agitación: 700 rpm hasta las 18 horas, incrementando posteriormente hasta 1.200 rpm para mantener  $DO_2 > 50\%$ . (III) Presión: 0 kg/cm<sup>2</sup>.  
5 (IV) Temperatura: 20°C hasta las 72 horas y posteriormente a 17°C. (V) pH: control de límite inferior a 4,5 con amoniaco al 12,5% hasta las 72 horas disminuyendo posteriormente el límite a 3,0. (VI)  $DO_2$ : control con límite inferior al 50% mediante agitación. (VII) Iluminación: 6  
10 tubos fluorescentes dispuestos sobre la superficie del vaso con una potencia total de 80 vatios.

Las adiciones realizadas fueron las siguientes: (I) Glucosa en solución al 50% conforme al siguiente programa de adición (expresado como gramos de glucosa pura por litro y hora): 0 entre las 0-25 horas, 2,5 entre las 26-51 horas, 15 2,3 entre las 52-116 horas y 1,6 entre las 117-212 horas. El consumo total de glucosa al 50% en adiciones fue de 6,47 litros. (II) Etanol absoluto: 0,5% cada 24 horas desde las 72 horas. El consumo total fue de 270 ml. (III) Antiespuma: 20 Polipropilenglicol (PPG), cuyo consumo total fue de 200 ml. (IV) Amoniaco al 12,5% para control de pH, con un consumo total fue de 464 ml.

Asimismo, se realizaron las cosechas parciales necesarias para mantener el volumen de trabajo en 10 litros. El volumen total de cosechas parciales fue de 2,6 litros y el volumen final del tanque de 8,5 litros. La fermentación finalizó a las 212 horas con una biomasa del 32% (expresada como PCV) que era equivalente a 84 g/l (expresada como peso seco). La concentración de astaxantina 25 valorada por HPLC fue de 425 mg/l, de forma que la riqueza en astaxantina de la biomasa seca superó las 5.000 ppm. La concentración total de carotenoides acumulados fue de 623 mg/l (7.416 ppm). La evolución de la fermentación se 30 ilustra en la figura 9.

**EJEMPLO 12****Procedimiento de producción de astaxantina mediante la fermentación de *X. dendrorhous* en fermentador de 800 litros**

El medio de cultivo de inóculo (R4-062-7, ejemplo 1) 5 se preparó en matraces Erlenmeyer de 2.000 ml a razón de 200-400 ml por matraz. Una vez esterilizados se sembraron con *X. dendrorhous* y se incubaron a 20°C y 250 rpm durante 48 horas. El inóculo se transfirió estérilmente en una 10 proporción del 0,4% (v/v) a un tanque intermedio de crecimiento vegetativo con medio de cultivo R4-10-2 cuya composición por litro es: extracto de levadura 6,2 g, Pharmamedia 5,5 g, jarabe de glucosa (70% p/p) 143 g (esterilizado por separado), corn steep sólido 24 g, fosfato monopotásico 2 g, fosfato dipotásico 0,4 g, sulfato 15 magnésico heptahidrato 1,5 g, fosfato diamónico 5 g, cloruro sódico 0,2 g, cloruro cálcico dihidrato 0,4 g, antiespuma 0,1 g, clorhidrato de tiamina 1 mg, ácido bórico 1 mg, molibdato sódico dihidrato 0,4 mg, sulfato de zinc heptahidrato 0,8 mg, cloruro férrico hexahidrato 0,4 mg, 20 sulfato de cobre pentahidrato 0,8 mg, yoduro potásico 0,2 mg, sulfato de manganeso tetrahidrato 0,8 mg. Su pH inicial fue de 5,6. El vegetativo se incubó a 17°C durante 54 h, con una aireación de 1,5 v/v/m y una presión en cabeza de 1 atmósfera, hasta que alcanzó un pH inferior a 3,5. Seguidamente se realizó una segunda fase de crecimiento en el 25 medio de cultivo R4-10-2 hasta alcanzar una biomasa del 30-35% (expresada como PCV). El fermentador de producción (800 litros de capacidad) con medio R4-10-2 se sembró con un 20% (v/v) del cultivo vegetativo.

30 La fermentación se realizó con el siguiente programa de temperaturas: 19°C hasta las 16 horas, 18°C desde las 16 hasta las 60 horas y 17°C hasta el final. Se utilizó agitación variable entre 150 y 275 rpm y una aireación de 1,5 v/v/m. La presión en cabeza se mantuvo en 0,5 atm. El

- 33 -

control de pH se realizó con hidróxido amónico 25%, manteniéndose superior a 4,5 hasta las 24h, a 3,5 desde las 24 hasta las 60 horas y a 3,0 desde las 60 horas hasta el final. El oxígeno disuelto se mantuvo en un rango superior 5 al 50%, incrementando la agitación cuando fue necesario. Durante la fermentación se realizaron adiciones de glucosa (expresado en Kg/m<sup>3</sup>/hora) de acuerdo con el siguiente programa: 0 entre las 0-24 horas, 4,41 entre las 24-48 horas, 3,77 entre las 48-70 horas, 2,08 entre las 70-94 10 horas y 2,60 entre las 94-184 horas.

Asimismo, cuando fue necesario se realizaron (i) adiciones de antiespuma y (ii) cosechas parciales para mantener el volumen en el fermentador en torno al 75% de su capacidad total. La iluminación del cultivo se realizó por 15 medio de un tubo de borosilicato de 1 m de longitud sumergido en el cultivo que contenía 6 tubos fluorescentes de 54 w (total 324 w). La fermentación se prolongó durante 184 horas, al cabo de las cuales se obtuvo una producción de astaxantina de 400 mg/l y una biomasa de 90 g/l (expresada como peso seco), lo cual supone una riqueza de 20 astaxantina en la biomasa seca superior a 4.400 ppm.

La adición de 50 µM de duroquinona supuso incrementos de producción de astaxantina de alrededor del 15-20%.

25 **EJEMPLO 13**

**Proceso de recuperación de la biomasa de *X. dendrorhous* rica en astaxantina y análisis de biodisponibilidad en trucha**

La levadura *X. dendrorhous*, fermentada en cultivo puro 30 tal y como se describe en los ejemplos anteriores, se transfirió desde el fermentador hasta un tanque refrigerado donde permaneció hasta que se recuperó por centrifugación o filtración. La concentración preliminar del caldo se realizó mediante centrífugas en continuo o unidades de filtra-

- 34 -

ción, dando lugar a caldos concentrados. Con la finalidad de proteger la astaxantina durante el procesamiento de la biomasa en algunos casos se adicionó el antioxidante etoxiquina a la biomasa concentrada. Seguidamente, se procedió al secado de la biomasa concentrada, utilizando métodos convencionales, de forma que la mayor parte de las células no se rompieran durante el proceso. Por último se realizó el almacenamiento de la biomasa seca de forma que quedara protegida de luz, oxígeno y humedad.

La biomasa seca se mezcló con un preparado alimenticio utilizado en piscicultura de forma que la concentración de astaxantina en la mezcla fuera de 75 ppm. Seguidamente, la mezcla se extrusionó en forma de cilindros o pellets, con los cuales se alimentaron una serie de truchas durante dos meses. Posteriormente se sacrificaron 10 truchas seleccionadas al azar y se valoró el contenido en astaxantina y carotenoides en su tejido muscular. Asimismo, se analizó el contenido en astaxantina y carotenoides en otras 10 truchas control no alimentadas con los pellets anteriormente descritos. Los valores medios obtenidos se muestran en la tabla siguiente:

	Truchas alimentadas con biomasa seca	Truchas control no alimentadas con biomasa seca
Astaxantina ( $\mu$ g/g)	3,5	0,0
Carotenoides ( $\mu$ g/g)	6,8	0,1

Los resultados de la prueba de biodisponibilidad demuestran que la astaxantina y el resto de los carotenoides presentes en la biomasa seca de *X. dendrorhous* se transfirieron a los tejidos de la trucha confiriéndole una atractiva coloración asalmonada.

- 35 -

**Descripción detallada de las figuras**

**Figura 1.** Fotografía de un gel de agarosa en el que se muestra el ADN total de una serie de cepas de *X. dendrorhous* que presentan diferente producción de astaxantina. Carril 1: Marcador de peso molecular de ADN cuyas bandas poseen los siguientes tamaños expresados en pares de bases: 23.130, 9.416, 6.557, 4.361, 2.322, 2.027, 1.353, 1.078, 872, 603 y 300. Carril 2: *X. dendrorhous* CECT 1690 (también denominada ATCC24202 ó CBS 5905). Carril 3: *X. dendrorhous* CECT 11028 (también denominada ATCC 24203 ó CBS5908). Carril 4: *X. dendrorhous* CBS 6938. Carril 5: *X. dendrorhous* ATCC 24229. Carril 6: *X. dendrorhous* Y-989. Carril 7: *X. dendrorhous* Y-2240; Carril 8: *X. dendrorhous* Y-2259. Carril 9: *X. dendrorhous* Y-2279. Carril 10: *X. dendrorhous* Y-2410. Carril 11: *X. dendrorhous* Y-2476. En la parte superior de la figura aparece el ADN total (tamaño superior a 23 kb) y bajo él se encuentran los elementos extracromosómicos (tamaño entre 2,3 y 9 kb).

20

**Figura 2.** Fotografía de un gel de agarosa en el que se muestra ADN total de una serie de cepas de *X. dendrorhous* en tres condiciones diferentes: (A) Control (SSC 0,01x, sin tratamiento con Rnasa A). (B) Tratado con Rnasa A a una concentración de 350 ng/ml en SSC 0,01x. (C) Tratado con RNasa A a una concentración de 350 ng/ml en SSC 2x. Carriles 1-3: *X. dendrorhous* CECT 1690 (también denominada ATCC24202 ó CBS 5905). Carriles 4-6: *X. dendrorhous* CECT 11028 (también denominada ATCC 24203 ó CBS5908). Carriles 7-9: *X. dendrorhous* CBS 6938. Carriles 10-12: *X. dendrorhous* ATCC 24229. Carriles 13-15: *X. dendrorhous* Y-989. Carriles 16-18: *X. dendrorhous* Y-2240. Carriles 19-21: *X. dendrorhous* Y-2410. Carriles 22-24: *X. dendrorhous* Y-2476. Carril 25: Marcador de peso molecular de ADN cuyas

- 36 -

bandas poseen los siguientes tamaños expresados en pares de bases: 23.130, 9.416, 6.557, 4.361, 2.322 y 2.027.

**Figura 3.** Fotografía de un gel de agarosa en el que se muestra el ADN total de *X. dendrorhous* Y-2410 tratado con distintas enzimas modificadoras de ácidos nucleicos. Carril 1: Marcador de peso molecular de ADN cuyas bandas poseen los siguientes tamaños expresados en pares de bases: 23.130, 9.416, 6.557, 4.361, 2.322, 2.027, 1.353 y 1.078. Carril 2: ADN control sin tratamiento. Carril 3: Tratamiento con RNasa A en 2x SSC. Carril 4: Tratamiento con RNasa A en 1x SSC. Carril 5: Tratamiento con RNasa A en 0,02x SSC. Carril 6: Tratamiento con RNasa A en 0.01x SSC. Carril 7: Tratamiento con RNasa H. Carril 8: Tratamiento con nucleasa S1. Carril 9: Tratamiento con DNasa I. Carril 10: Digestión con la endonucleasa de restricción *Bam*HI.

**Figura 4.** Izquierda: gel de agarosa de las cepas *X. dendrorhous* CBS 6938 (carril 1) y *X. dendrorhous* Y-2410 (carril 2). Centro: segunda dimensión de la electroforesis del carril 1 correspondiente a *X. dendrorhous* CBS 6938. Derecha: segunda dimensión de la electroforesis del carril 2 correspondiente a *X. dendrorhous* Y-2410.

**Figura 5.** Fotografía de un gel de agarosa en la que se muestra el ADN de una serie de cepas de *X. dendrorhous* amplificado mediante la técnica RAPD (randomly amplified polymorphic DNA). Carriles 1 y 12: Marcador de peso molecular de ADN cuyas bandas poseen los siguientes tamaños expresados en pares de bases: 1.353, 1.078, 872, 603 y 300. Carril 2: *X. dendrorhous* CECT 1690 (también denominada ATCC24202 ó CBS 5905). Carril 3: *X. dendrorhous* CECT 11028 (también denominada ATCC 24203 ó CBS5908). Carril 4: *X. dendrorhous* CBS 6938. Carril 5: *X. dendrorhous* ATCC 24229.

- 37 -

Carriel 6: *X. dendrorhous* Y-989. Carriel 7: *X. dendrorhous* Y-2240. Carriel 8 : *X. dendrorhous* Y-2259. Carriel 9: *X. dendrorhous* Y-2279. Carriel 10: *X. dendrorhous* Y-2410. Carriel 11: *X. dendrorhous* Y-2476.

5

**Figura 6.** Producción de astaxantina (ordenadas) mediante fermentación en matraz de la cepa *X. dendrorhous* Y-2476, adicionando al medio de fermentación los siguientes compuestos: duroquinona -D-, retinal -R-, ácidos 10 trispóricos -AT- o glutamato -GT-. La producción se expresa en porcentaje respecto de la condición estándar -P- (100%).

10

**Figura 7.** Producción específica de astaxantina de *X. dendrorhous* Y-2410 en 7 medios de cultivo diferentes 15 diseñados mediante el programa GALOP, el cual está basado en algoritmos genéticos. Los medios de cultivo denominados P, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 se muestran en el eje de abscisas. En el eje de ordenadas se muestran los valores de producción específica expresados en ppm ( $\mu$ g/g).

20

**Figura 8.** Producción de astaxantina mediante fermentación en matraz de la cepa *X. dendrorhous* Y-2476. (A) Iluminando el cultivo con diferentes tipos de luz: Oscuridad -O-, blanca -B-, azul -A-, verde -V-, amarilla -AM- y ultra-violeta -UV-; (B) Iluminando el cultivo con diferentes ciclos de luz blanca o ultravioleta: Blanca permanente -BP-; UVA permanente -UVAP-; Blanca 24 horas -B24h-; UVA24h-; Blanca 12 horas -B12h-; UVA 12h; UVA6h. La producción se expresa en porcentaje respecto de la condición estándar 30 (100%).

30

**Figura 9.** Evolución de la producción de astaxantina durante la fermentación de la cepa *X. dendrorhous* Y-2476 en fermentador de 10 litros. Ordenadas (izquierda): PCV (%)

- 38 -

DO2 (%) — y glucosa (g/l) ♦. Ordenadas (derecha):  
astaxantina HPLC (mg/l) ●, carotenoides (mg/l) ▲, Abcisas:  
tiempo en horas.

## REIVINDICACIONES

1.- Procedimiento de producción de astaxantina por  
5 fermentación caracterizado por cultivar las cepas de *X. dendrorhous* que aparecen en el esquema 2 de la descripción o sus mutantes o derivados transformados capaces de producir en matraz al menos 4.000 ppm de astaxantina a los 6-7 días de fermentación.

10

2.- Procedimiento de fermentación de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque en fermentación industrial se alcanza un nivel de producción de al menos 5.000 ppm de astaxantina a los 7-9 días de fermentación.

15

3.- Procedimiento de fermentación de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado por adicionar duroquinona durante el proceso de fermentación.

20

4.- Procedimiento de fermentación de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizado porque la duroquinona se adiciona a una concentración 25-50  $\mu\text{M}$ .

25

5.- Procedimiento de fermentación de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado por adicionar retinal durante el proceso de fermentación.

30

6.- Procedimiento de fermentación de acuerdo con la reivindicación 5, donde el retinal se adiciona a una concentración 35  $\mu\text{M}$ .

7.- Procedimiento de fermentación de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado por adicionar ácidos trispóricos durante el proceso de fermentación.

- 40 -

8.- Procedimiento de fermentación de acuerdo con la reivindicación 7, caracterizado porque los ácidos trispóricos se adicionan a una concentración de 50-100 µg/ml.

5

9.- Procedimiento de fermentación de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado por adicionar glutamato durante el proceso de fermentación.

10 10.- Procedimiento de fermentación de acuerdo con la reivindicación 9, caracterizado porque el glutamato se adiciona a una concentración de 5,5 mg/ml.

15 11.- Procedimiento de fermentación de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado por utilizar para el proceso de fermentación el medio 5 descrito en la tabla I de la descripción.

20 12.- Procedimiento de fermentación de acuerdo con la reivindicación 11, caracterizado por producir en matraz 4.490 ppm de astaxantina a los de 6-7 días de fermentación.

25 13.- Procedimiento de fermentación de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado por iluminar el caldo de fermentación durante el proceso de fermentación.

30 14.- Procedimiento de fermentación de acuerdo con la reivindicación 13, caracterizado porque la fuente de iluminación utilizada es de luz blanca.

15.- Procedimiento de fermentación de acuerdo con la reivindicación 13, caracterizado porque la fuente de iluminación utilizada es de luz ultravioleta.

- 41 -

16.- Procedimiento de fermentación de acuerdo con la reivindicaciones 13 a 15, caracterizado por iluminar desde el inicio hasta el fin de la fermentación, preferentemente entre las 40 y 200 horas.

5

17.- Procedimiento de fermentación de acuerdo con la reivindicación 16, caracterizado por utilizar ciclos de 6 horas de iluminación / oscuridad.

10 18.- Procedimiento de fermentación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, caracterizado por:

- (a) Sembrar inóculos de *X. dendrorhous*.
- (b) Cultivar los inóculos de *X. dendrorhous* durante 48 horas a 20°C.
- (c) Sembrar fases de cultivo primario de *X. dendrorhous* con alrededor del 0,4% (v/v) de la fase de inóculo.
- (d) Cultivar las fases primarias de *X. dendrorhous* durante 48-54 horas a 17-20°C.
- 15 (e) Sembrar cada fermentador con el 20% (v/v) de las fases primarias de *X. dendrorhous*.
- (f) Incubar la fermentación durante 60-72 horas a 18-20°C y los 5-7 días restantes a 17°C.

20 19.- Procedimiento de fermentación de acuerdo con la reivindicación 18, caracterizado por producir al menos 425 mg/l de astaxantina a los 7-9 días.

25 20.- Procedimiento de fermentación de acuerdo con las reivindicaciones 18 y 19, caracterizado por producir concentraciones de biomasa de al menos 50 gramos de peso seco de células por litro de caldo de fermentación.

- 42 -

21.- Procedimiento de fermentación de acuerdo con la reivindicación 20, caracterizado por producir concentraciones de biomasa de al menos 80 gramos de peso seco de células por litro de caldo de fermentación.

5

22.- Procedimiento de fermentación de acuerdo con las reivindicaciones 18 a 21, caracterizado por producir al menos 5.000 µg de astaxantina por gramo de peso seco de células a los 7-9 días de fermentación.

10

23.- Biomasa de *X. dendrorhous* con valor nutritivo y pigmentante, obtenible por el proceso de fermentación descrito en las reivindicaciones 1 a 22, para su uso en alimentación humana y animal.

15

24.- Biomasa de acuerdo con la reivindicación 23, caracterizada por contener:

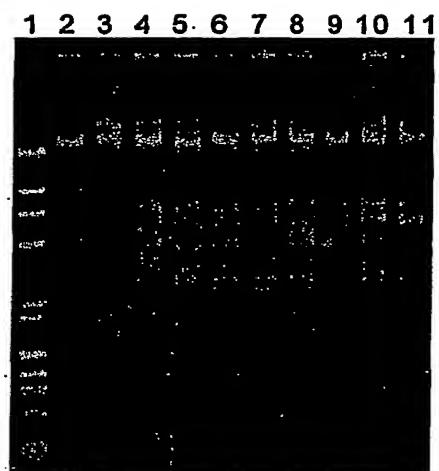
- a) Una concentración de al menos 5.000 µg/g astaxantina;
- b) Una concentración de al menos 7.400 µg/g de carotenoides totales;
- c) Una concentración de al menos el 15% de proteínas y
- d) Una concentración de al menos el 15% de hidratos de carbono.

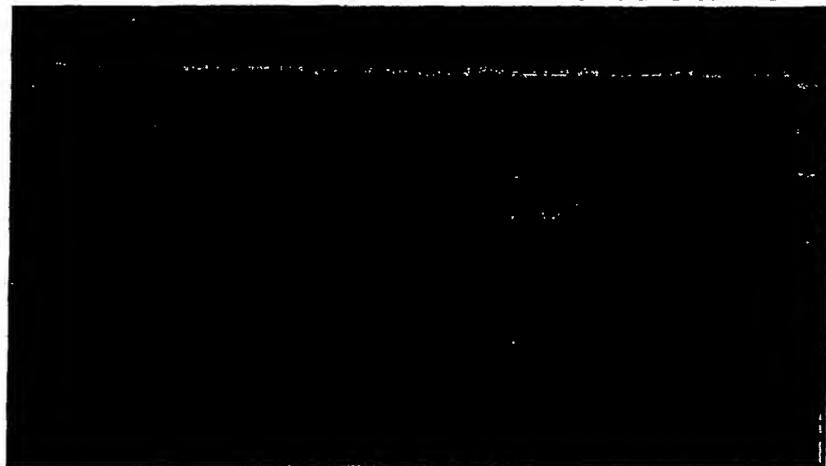
25 25.- Compuestos para alimentación animal que consistan en o contengan la biomasa de las reivindicaciones 23 y 24.

26.- Compuestos para alimentación humana que consistan en o contengan la biomasa de las reivindicaciones 23 y 24.

30

1/9

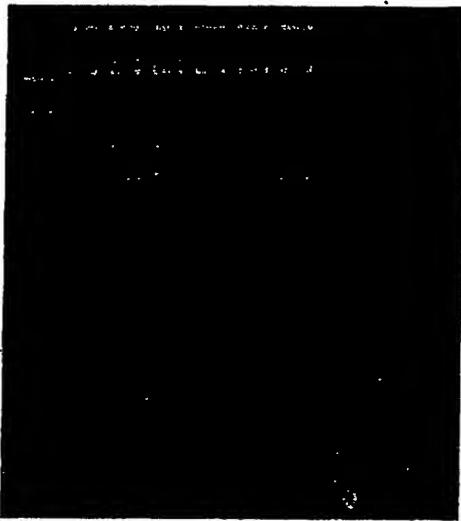
**FIGURA 1**



## FIGURA 2

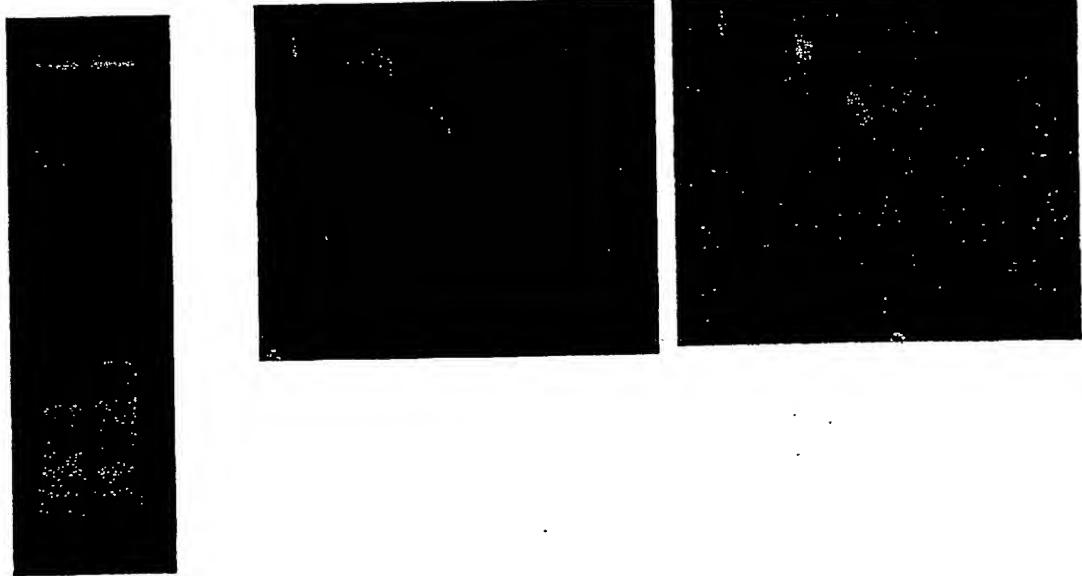
3/9

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

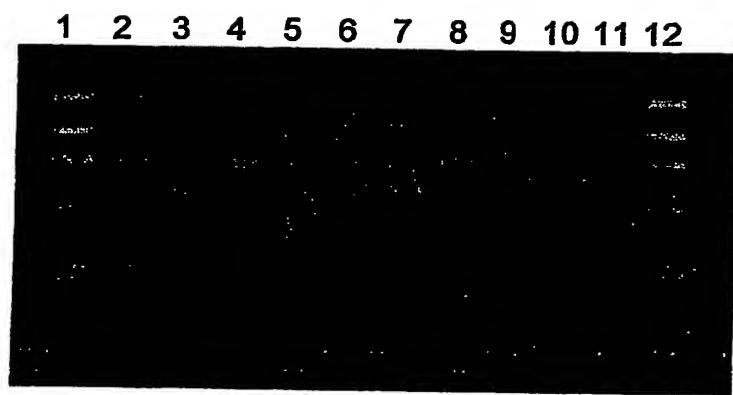


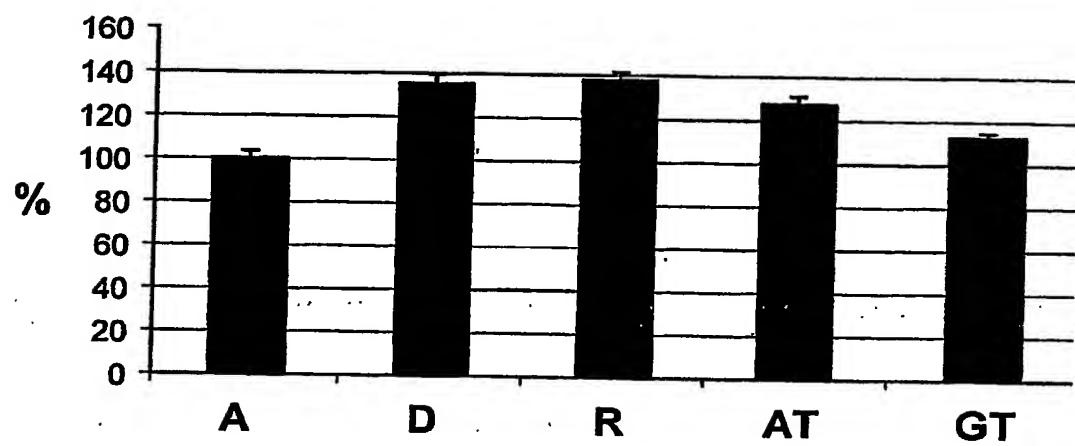
**FIGURA 3**

1 2



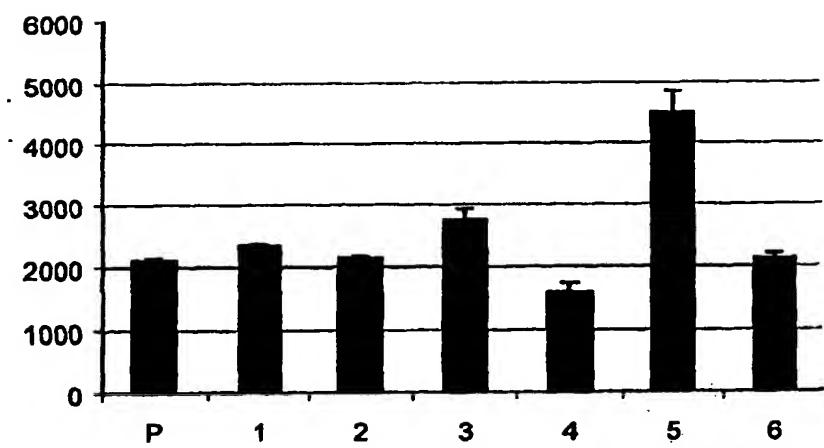
**FIGURA 4**

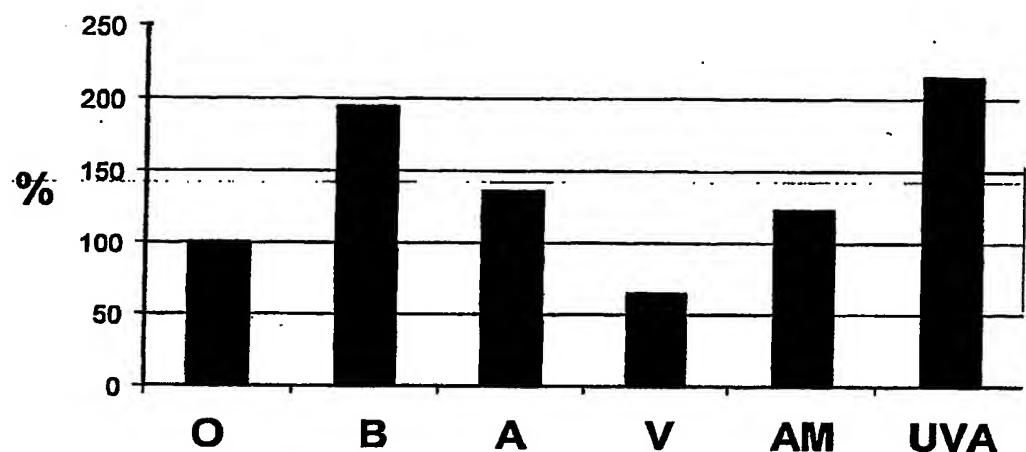
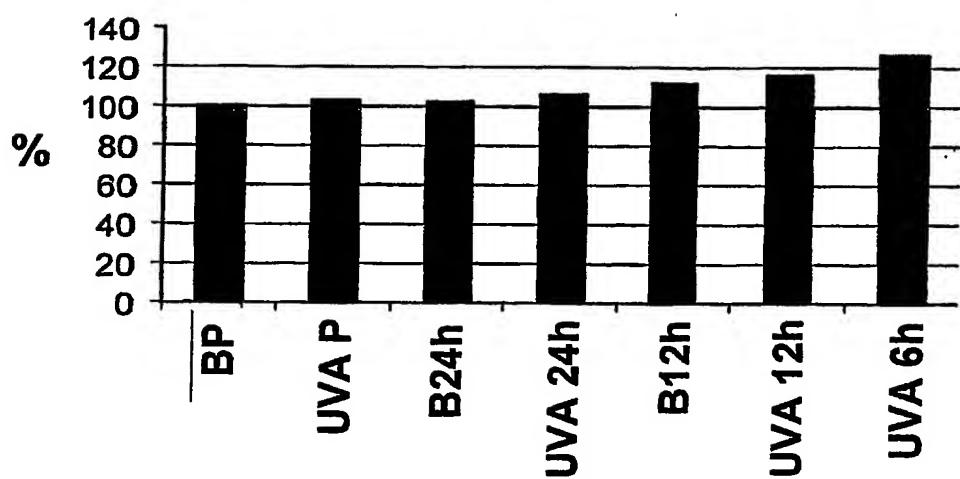
**FIGURA 5**

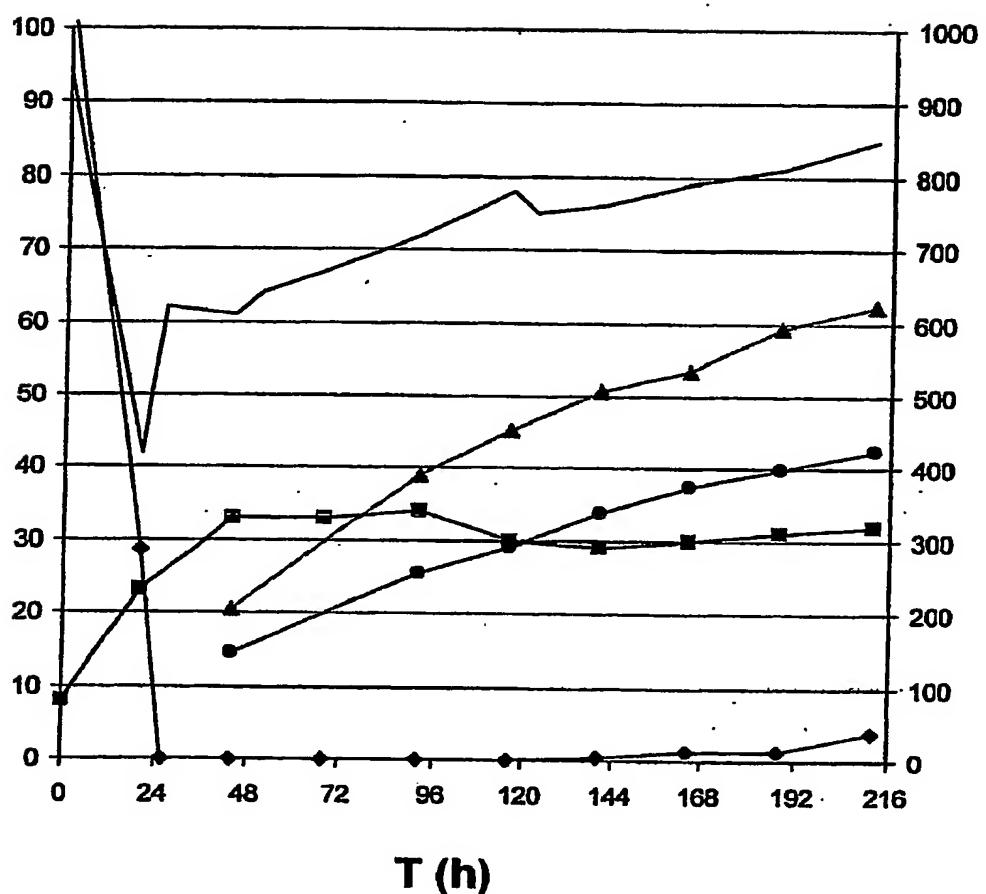


**FIGURA 6**

7/9

**FIGURA 7**

**FIGURA 8A****FIGURA 8B**

**FIGURA 9**

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/ES 03/00063

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC<sup>7</sup> C12P 23/00, C12N 1/16, A23K 1/18, A23L 1/28// (C12N 1/16, C12R 1:645)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC<sup>7</sup> C12P, C12N, A23K, A23L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CIBEPÁT, WPI, HCAPLUS, EPODOC

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 9423594 A1 (UNIVERSAL FOODS CORPORATION) 27.10.1994. Tables 1, 2, 3; examples 6 and 10	1,2,,13-15,23,25,26
X	EP 438182 A1 (PHILLIPS PETROLEUM COMPANY) 24.07.1991. Table I and claims 9-11	1,2
A	ES 2115637 T3 (GIST-BROADES N.V.) 01.07.1998	
A	EP 474347 A1 (QUEST INTERNATIONAL B.V.) 11.03.1992	

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

- “A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- “B” earlier document but published on or after the international filing date
- “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
**12 May 2003 (12.05.03)**

Date of mailing of the international search report  
**20 May 2003 (20.05.03)**

Name and mailing address of the ISA/

S.P.T.O.

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No

PCT/ES 03/00063

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9423594 A1	27.10.1994	AU 5008693 A US 5466599 A NO 9540052 A EP 708604 A JP 8508885 T NZ 255742 A AU 688280 B US 5922560 A US 6015684 A US 6413736 B	08.11.1994 14.11.1995 11.12.1995 01.05. 1996 24.09.1996 26.05.1997 13.03.1998 13.07.1999 18.03.2000 02.07.2002
EP 438182 A1	24.07.1991	FI 910284 A CA 2027835 A NO 910211 A AU 6930291 A IE 910177 A JP 7046980 A	20.07.1991 02.07.1991 22.07.1991 25.07.1991 31.07.1991 21.05.1995
ES 2115637 T3	01.07.1998	WO 9312249 A EP 0551676 AB NO 932904 A JP 6506122 T US 5648261 A AT 165396 T DE 69225208 T US 5879927 A LU 12319 AB	24.06.1993 21.07.1993 16.08.1993 14.04.1994 15.07.1997 15.05.1998 01.10.1998 09.03.1999 20.07.1999
EP 474347 A1	11.03.1992	NO 912846 A CA 2047000 A JP 5076347 A	21.01.1992 21.01.1992 30.03.1993

## INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional  
PCT/ES 03/0006A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD  
CIP<sup>7</sup> C12P 23/00, C12N 1/16, A23K 1/18, A23L 1/28// (C12N 1/16, C12R 1:645)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

## B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima consultada (sistema de clasificación, seguido de los símbolos de clasificación)  
CIP<sup>7</sup> C12P, C12N, A23K, A23L

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

CIBEPAT, WPI, HCAPLUS, EPODOC

## C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	WO 9423594 A1 (UNIVERSAL FOODS CORPORATION) 27.10.1994. Tablas 1,2,3; ejemplos 6 y 10	1,2,,13-15,23,25,26
X	EP 438182 A1 (PHILLIPS PETROLEUM COMPANY) 24.07.1991. Tabla 1 y reivindicaciones 9-11.	1,2
A	ES 2115637 T3 (GIST-BROADES N.V.) 01.07.1998	
A	EP 474347 A1 (QUEST INTERNATIONAL B.V.) 11.03.1992	

 En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos Los documentos de familia de patentes se indican en el anexo

\* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.

"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.

"&amp;" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional. 12 mayo 2003 (12.05.2003)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

20 MAY 2003

20.05.03

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M

Funcionario autorizado

Juana LÓPEZ NIETO

c/ Panamá 1, 28071 Madrid, España  
nº de fax +34 91 3495304

nº de teléfono +34913495536

**INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL**  
Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional

PCT/ES 03/00063

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
WO 9423594 A1	27.10.1994	AU 5008693 A US 5466599 A NO 9540052 A EP 708604 A JP 8508885 T NZ 255742 A AU 688280 B US 5922560 A US 6015684 A US 6413736 B	08.11.1994 14.11.1995 11.12.1995 01.05.1996 24.09.1996 26.05.1997 13.03.1998 13.07.1999 18.03.2000 02.07.2002
EP 438182 A1	24.07.1991	FI 910284 A CA 2027835 A NO 910211 A AU 6930291 A IE 910177 A JP 7046980 A	20.07.1991 02.07.1991 22.07.1991 25.07.1991 31.07.1991 21.05.1995
ES 2115637 T3	01.07.1998	WO 9312249 A EP 0551676 AB NO 932904 A JP 6506122 T US 5648261 A AT 165396 T DE 69225208 T US 5879927 A LU 12319 AB	24.06.1993 21.07.1993 16.08.1993 14.04.1994 15.07.1997 15.05.1998 01.10.1998 09.03.1999 20.07.1999
EP 474347 A1	11.03.1992	NO 912846 A CA 2047000 A JP 5076347 A	21.01.1992 21.01.1992 30.03.1993